発現プラスミドの構築

1. インサート DNA の調製

開始コドンは出来るだけ 5'UTR に近い位置に挿入して下さい。経験的に pTD1 の EcoRV/KpnI サイトへのライゲーション効率が最も高いことを確認しています。本プロトコルに従うと、インサートサイズにも依りますが、90%以上のコロニーがインサートの挿入されたクローンとして得られます。可能な限り *Eco*RV/*Kpn*I サイトへ挿入されるお奨めします。ちなみに、*Eco*RV/*Eco*RI サイトに挿入した場合のクローニング効率は 20～30%、*Eco*RV/*Bam*HI では＜10%程度となります。*Sma*I および *Xba*I については検討を行っておりません。

① プライマー設計

以下の 2 種類のプライマーを合成します（脱塩グレードで問題ありません。）。
合成タンパクにアフィニティ精製用のタグを付加する場合は、「合成タンパク質のアフィニティ精製」をご参照下さい。

○ N 末端プライマー： 5'-ATGNNNNNNNNNNNNNN･･･-3' （N：目的遺伝子の配列）
開始コドン

- 15-30 mer で設計し、2×（A と T の数）+4×（G と C の数）=55-60 前後となるよう設計してください。
- 成熟領域などを発現させる場合においても開始コドンを目的配列の直前に入れるよう設計してください。
- PCR 産物のリン酸化ステップを省くため、5' 末端リン酸化プライマーをご使用いただいても構いません。

○ C 末端プライマー： 5'-GGGGTACCTTANNNNNNNNNN･･･-3' （N：目的遺伝子の配列）
*Kpn*I stop コドン

- 25-40 mer で設計し、ストップコドン以降の配列は 2×（A と T の数）+4×（G と C の数）=55-60 前後となるよう設計してください。
- 制限酵素サイトの前に 2-3 塩基の付加配列を設けてください。KpnI の場合は GG の 2 塩基を付加しています。その他の制限酵素については、各メーカーからの情報をご参照下さい。
- 挿入する制限酵素サイトとしては目的遺伝子内にその制限酵素サイトが無いものを選択してください。
- Stop コドンに関しては、目的遺伝子に対応するコドンで結構です。

② 目的遺伝子の増幅

PCR は、Terminal transferase 活性が無い Fidelity の高い酵素をご使用下さい。
以下に KOD plus（TOYOBO 社 KOD-201）を用いた場合の反応条件を記します。

cDNA	5ng※	96℃	2min	
10×Buffer	5μL	96℃	15sec	30 サイクル
dNTP（2mM each）	5μL	50℃	30sec	
25mM MgSO4	2μL	68℃	1min/kbp	
N 末端プライマー（10μM）	1.5μL	68℃	7min	
C 末端プライマー（10μM）	1.5μL	4℃	∞	
KOD plus	1μL			
H2O	to 50μL			

※ ゲノムを鋳型とする場合は添加量の検討を行ってください。

- 反応液 2μL をアガロースゲル電気泳動に供し、目的サイズの位置にバンドがあることを確認します。
- フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿により増幅産物を精製します。また、各社より市販されている精製キットをご使用頂いても構いません。
以下では、市販精製キットを用いた例を示します。
使用キット： QIAquick PCR Purification Kit (50)（QIAGEN、28104） 詳細はキットの取扱説明書をご覧下さい。

  - 48μL の PCR 反応液と 250μL の Binding Buffer（BP）を混合し、全量をカラムにアプライする。
  - 13000rpm、1 分間の遠心後、カラムをスルーした液を捨てる。

Copyright © 2007 Shimadzu Corp. All Rights Reserved.

- 750μL の PE をカラムにアプライし、13000rpm、1 分間の遠心後、カラムをスルーした液を捨てる。
- 更に、15000rpm、2 分間の遠心を行う。
- 50μL の Elution Buffer(EB)をカラムにアプライし、新しいチューブにカラムをセットする。
- 13000rpm、1 分間の遠心を行い溶出させる。

③ 5' 末端のリン酸化

PCR 産物の 5' 末端をリン酸化します。
以下に TOYOBO 社製の T4 Polynucleotide Kinase(PNK-111)を用いたリン酸化の例を示します。

- カラム精製の場合は、25μL の溶液に 50μL の Denaturation Buffer を加えます。
  フェノール抽出/エタノール沈殿による精製の場合は、沈殿を 35uL の Denaturation Buffer に溶解します。
- 90℃2 分間の熱処理後、氷中で急冷します。
- リン酸化反応

	カラム精製	フェノール抽出/エタノール沈殿の場合
DNA 溶液	75μL	35μL
Blunt End Kinase Buffer	10μL	5μL
0.1M ATP	1μL	0.5μL
T4 Polynucleotide Kinase	2μL	1μL
H2O	12μL	8.5μL
	100μL	50μL

- 37℃、1 時間反応後、反応液を 90℃で 2 分間処理し、室温になるまでゆっくり冷まします。
- エタノール沈殿により精製します(①の3. をご参照下さい)。
- 沈殿を 85μL の滅菌水に溶解し、C 末端プライマーに導入した制限酵素で消化します。
  制限酵素処理後に電気泳動を行っても、切断断片は確認することはできません。切断を行う前に、酵素活性が保持されていることをご確認下さい。

DNA 溶液	85μL
10×Buffer	10μL
制限酵素	30-50U

純水で 100μL に調整後、37℃、2 時間で反応

- フェノール精製や市販の精製キットを用いて精製します。
- 一部を分光光度計にて定量します。

2. 発現ベクター(pTD1)の調製

5μg の pTD1 を *Eco*RV で消化します。

pTD1	5μg (キット添付の DNA をお使いの場合は 10μL)
10×Buffer	5μL
*Eco*RV	30 U

純水で 50μL に調整後、37℃、1 時間で反応

- 反応液 1μL をアガロースゲル電気泳動に供し、約 3 kbp の位置にバンドがあることを確認します。
- エタノール沈殿により精製します。 EcoRV と Buffer が同一でも高いライゲーション効率を得るために、一度エタノール沈殿で精製した後、もう一方の制限酵素消化を行うことをお奨めします。

Copyright © 2007 Shimadzu Corp. All Rights Reserved.

*Eco*RV 消化 pTD1	49μL	
共沈剤(*)	10μL	* Edge BioSystems (70437)
100% エタノール	150μL	

- 室温で 5 分間放置後、15000rpm、5 分間遠心する
- 上清を廃棄し、70% エタノールを加えて沈殿を洗った後、15000rpm、5 分間遠心する
- エタノールを完全に取り除き、チューブの蓋を開けたまま室温で 5 分間放置して沈殿を乾燥させる
- 沈殿を 85μL の滅菌水に溶解し、もう一方の制限酵素で消化します。
  制限酵素処理後に電気泳動を行っても、切断断片は確認することはできません。切断を行う前に、酵素活性が保持されていることをご確認下さい。

DNA 溶液	85μL
10×Buffer	10μL
制限酵素	30-50U

純水で 100μL に調整後、37℃、2 時間で反応

- フェノール精製や市販の精製キットを用いて精製します。
  ここでは、市販キットを用いた精製例を示します。
  使用キット: QIAquick PCR Purification Kit (50)(QIAGEN 社 28104) 詳細はキットの取扱説明書をご覧下さい。

  - 100μL の酵素消化液と 500μL の Binding Buffer(BP)を混合し、全量をカラムにアプライする。
  - 13000rpm、1 分間の遠心によりカラムをスルーした液を捨てる
  - 750μL の PE をカラムにアプライし、13000rpm、1 分間の遠心によりカラムをスルーした液を捨てる
  - 更に、15000rpm、2 分間の遠心を行う。
  - 50μL の Elution Buffer(EB)をカラムにアプライ後、新しいチューブにカラムをセットする。
  - 13000rpm、1 分間の遠心を行い溶出させる。
  - 溶出液の一部を用いて分光光度計(260nm)にて定量します。
    50μL の Elution buffer で溶出した場合、約 70ng/μL のベクターが得られます。

3. ライゲーション

1および**2**で作製したインサートとベクターをライゲーションします。
ここでは NEW ENGLAND Biolabs 社製の Quick Ligation™ Kit(M2200S)を用いたライゲーション反応の例を示します。

ベクター(10μg/mL)	2μL
インサート	ベクター:インサート量比が 1:10 になるよう添加
2×Quick Ligation Reaction Buffer	10μL
Quick T4 DNA Ligase	1μL

純水で 20μL に調整後 25℃、5 分間反応

4. 形質転換

大腸菌を形質転換します(DH5αを推奨します)。
ここでは市販の E. coli DH5α Competent Cells(タカラバイオ、9057)を用いた例を記します。

- 2μL のライゲーション反応液に Competent Cells を 20μL 添加し、氷上で 30 分間静置します。
- 42℃で 1 分間熱処理し、再度氷上で 5 分間静置します。
- SOC 培地を 180μL 添加し 37℃で 1 時間インキュベートします。
- 培養液 100μL～全量を LB アンピシリンプレートにストリークし、37℃で終夜培養します。

以上の操作で数十～数百の形質転換体が得られます。青白判別はできませんので、以下の方法によってインサート

Copyright © 2007 Shimadzu Corp. All Rights Reserved.

が挿入されたことを確認してください。

5. インサートチェック

目的遺伝子が挿入されたかどうかは、プラスミド抽出物またはコロニーからの PCR により確認してください。C 末端プライマーに *Kpn*I サイトを導入した場合は、ほとんどが目的遺伝子が挿入された形質転換体として得られるので、プラスミド抽出を推奨します。その他の制限酵素サイトを導入した場合は、コロニーからの PCR によりインサートチェックを行うことを推奨します。

○ プラスミド抽出

コロニーを LB アンピシリン培地（1.5 mL）に植菌し、37℃で終夜振とう培養します。培養液から GenElute™ PlasmidMiniprep Kit（SIGMA 社 PLN-70）などを用いてプラスミドを抽出します。精製したプラスミド溶液 5μL 分をアガロースゲル電気泳動に供し、uncut の pTD1 ベクターとの移動度を比較してください。

○ コロニーPCR

ここでは TOYOBO 社製 InsertCheck-Ready-Blue（PIK-251）を用いたインサートチェックの例を示します。

増幅用のプライマーとしては下記のものを使用してください。
pTD1-161-179: 5'-GCAGATTGTACTGAGAGTG-3'
pTD1-845-827: 5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3'

- InsertCheck-Ready-Blue 1 mL に対し、上記プライマーをそれぞれ 150 pmol ずつ（100μM であれば 1.5μL）添加し、PCR 混合液を作製します。
- PCR 混合液を 10μL ずつ PCR 用のチューブに分注します。
- コロニーをチップ（など）で突付き、コピー用の LB アンピシリンプレートに植菌します。
- PCR 混合液にチップを付けてすすぎ、PCR を行います。

PCR 条件

94℃	4 min	
94℃	30 sec	30 cycles
50℃	5 sec	
72℃	x sec※	

※ インサートのサイズ（kbp）＋0.7 kbp を計算してください。
その値が 2 kbp 以下の場合は 30 sec、2 kbp 以上の場合は 1 min/ 2.5 kbp で伸長時間を設定してください。

- 反応液を全量、アガロースゲル電気泳動に供し、インサートのサイズ（kbp）＋0.7 kbp の位置にバンドがあることを確認します。インサートが挿入されていないものは約 0.7 kbp の位置に泳動されます。

6. プラスミド抽出

インサートの挿入が確認された形質転換体について、LB アンピシリン培地に植菌し、プラスミド抽出を行ってください。この段階では、後の mRNA 合成用の鋳型として使用しますので、各社プラスミド抽出キットを使用してください。1.5 mL の培養液あたり 5μg 以上のプラスミドが取得できますので、mRNA の合成スケールに応じて培養量を選択してください。DNA 抽出キットを用い、インサートチェックを行った場合、本ステップは必要ありません。

7. シークエンス

本プロトコルで PCR 産物を pTD1 ベクターに挿入した場合、20%程度のクローンに開始コドンの A が欠落した変異が認められます。また、プライマー部位にも変異が認められるケースがありますので、最低でも下記 2 種のプライマーを用いてシークエンスを行ってください。また、極稀にですが内部配列にも変異が認められる場合がありますので、全長のシークエンスを確認することを推奨します。

Copyright © 2007 Shimadzu Corp. All Rights Reserved.

シークエンス用のプライマーとしては、pTD1-161-179（N 末端側プライマー）、pTD1-412-394（C 末端側プライマー、配列は下記を参照ください）の使用を推奨します。アニーリングは 50℃で行ってください。

○ pTD1-161-179: 5'-GCAGATTGTACTGAGAGTG-3'
○ pTD1-412-394: 5'-ACAACGCACAGAATCTAGC-3'

8. mRNA 合成用鋳型の調製

mRNA 合成用鋳型は、プラスミドを制限酵素により直鎖化、または PCR により調製します。いずれの方法を選択していただいても構いません（PCR で行う場合は Fidelity の高い酵素を選択してください）。

① 制限酵素による直鎖化

プラスミドを Hind Ⅲまたは *Not*I で消化してください。目的遺伝子中にこれらの制限酵素がある場合は、Transdirect *insect cell* 取扱説明書 7 ページ記載の酵素を用いて直鎖化してください。制限酵素処理後、RNase のコンタミネーションを防ぐためにフェノール/クロロホルム抽出を必ず行ってください。その後エタノール沈殿により精製し、少量の滅菌水に溶解します（125 μg/mL 以上となるよう注意してください）。

② PCR による鋳型の作製

下記条件にて PCR を行ってください。

Plasmid（1 ng/μL）	5 μL	96℃	2 min	
10×Buffer	5 μL	96℃	15 sec	30 cycles
dNTPs（2mM each）	5 μL	50℃	30 sec	
25 mM MgSO4	2 μL	68℃	1 min/ 1 kbp	
pTD1-161-179（10 μM）	1.5 μL	68℃	7 min	
pTD1-845-827（10 μM）	1.5 μL	4℃	∞	
KOD plus	1 μL			
H_2O	29 μL / 50 μL			

- 反応液 2 μL をアガロースゲル電気泳動に供し、目的サイズ（インサートのサイズ（kbp）＋0.7 kbp）の位置にバンドがあることを確認します
- フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿により増幅産物を精製します。PCR 産物を直接 mRNA 合成用の鋳型として使用することも可能ですが、最大限の無細胞タンパク質合成効率を得るために、フェノール/クロロホルム抽出 を行うことを推奨します。
- 少量の滅菌水または TE Buffer に溶解（50 μL の反応液あたり 20 μL 程度で溶解してください。）する
- 一部を分光光度計にて定量します（50 μL の反応液あたり 5 μg 以上の PCR 産物が取得できます）。

〈ご注意〉
本プロトコルは、他社製試薬キットの使用に関し、いかなる使用許諾を示唆するものではありません。
それぞれの製品の取扱説明書等に従い、適切なご使用をお願い致します。

Copyright © 2007 Shimadzu Corp. All Rights Reserved.